Arch

نشریه پژوهش‌های حفاظت آب و خاک
جلد بیست و هفتم، شماره دوم، ۱۳۹۹
۲۵-۴۵
http://jwsc.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/jwsc.2019.16529.3181

# کارایی هم‌زمان گیاه‌پالایی و زیست‌پالایی در حذف نفت خام از خاک

***هادی کوهکن[۱]، احمد گلچین[۲]، محمدصدیق مرتضوی[۳]، فاطمه شهریاری[۴] و رقیه همتی[۵]**

[۱]دانشجوی دکتری گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران، [۲]استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران، [۳]دانشیار پژوهشکده اکولوژی خلیج‌فارس و دریای عمان، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران، [۴]استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران، [۵]دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۱/۳۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۲۲

## چکیده

**سابقه و هدف:** فرآورده‌های نفتی از پرمصرف‌ترین مواد شیمیایی در دنیای مدرن امروز محسوب می‌شوند. هیدروکربن‌های نفتی به یک معضل جهانی برای محیط‌زیست تبدیل شده است. این ترکیبات در محیط به شدت مقاوم هستند و برای سلامتی انسان مضر هستند. کاربرد فرایند اصلاح زیستی برای حذف هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای از خاک‌های آلوده یکی از گزینه‌های اقتصادی و مطلوب می‌باشد. پس هدف از این آزمایش بررسی درصد حذف آلودگی هیدروکربنی خاک‌های آلوده به مواد هیدروکربنی (نفت خام) توسط کشت گیاهان سورگوم، جو و برموداگراس با و بدون تلقیح خاک با باکتری‌های *سودوموناس پوتیدا* و *آزوسپریلیوم براسیلنس* بود.

**مواد و روش‌ها:** در این آزمایش کارایی هم‌زمان گیاه‌پالایی و زیست‌پالایی در حذف نفت خام از خاک موردبررسی قرار گرفت. برای این منظور، یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار به اجرا در آمد. فاکتورها شامل سه سطح آلودگی خاک به نفت (صفر، ٤ و ٨ درصد وزنی)، چهار تیمار گیاهی (بدون گیاه، برموداگراس (*Cynodon dactylon*)، سورگوم (*Sorghum bicolor*) و جو (*Hordeum vulgare*)) و سه تیمار باکتری (بدون باکتری، *سودوموناس پوتیدا* و *آزوسپریلیوم براسیلنس*) بودند. برای انجام آزمایش نمونه‌های پنج کیلویی خاک با مقادیر مختلف نفت خام آلوده شدند و در گلدان‌های پلاستیکی ریخته شدند. پس از گذشت شش هفته و به تعادل رسیدن خاک‌های آلوده‌شده، این خاک‌ها با باکتری‌های *سودوموناس پوتیدا* و *آزوسپریلیوم براسیلنس* تلقیح شده و سپس در خاک‌های آلوده تلقیح‌شده با باکتری و تلقیح‌نشده سه گونه گیاهی گرامینه کاشته شدند و ۹۰ روز پس از کاشت گیاهان برداشت شدند.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که اثرات متقابل تمام تیمارها بر درصد حذف نفت خام خاک در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار گردیدند. درصد حذف نفت خام با کشت گیاه به‌تنهایی، تلقیح باکتری به‌تنهایی و کاربرد توأم گیاه و باکتری

* مسئول مکاتبه: koohkan_7001@yahoo.com



www.SID.ir

Archive of SID



به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت. کاشت گیاه نسبت به تلقیح خاک با باکتری در کاهش غلظت مواد نفتی مؤثرتر بود و کارکرد باکتری‌ها را به‌طور معنی‌دار افزایش داد. به‌طوری‌که بین تیمارهای گیاه به‌تنهایی، تلقیح باکتری به‌تنهایی و گیاه + باکتری تفاوت معنی‌داری از این لحاظ مشاهده شد. بیش‌ترین درصد حذف در تیمار کاربرد توأم گیاه و تلقیح باکتری مشاهده شد. در هر تیمار تلقیح خاک با باکتری، با افزایش سطوح آلودگی نفتی وزن خشک گیاهان کاهش یافت؛ اما در هر سطح از آلودگی نفتی، با تلقیح خاک با باکتری وزن خشک بخش هوایی افزایش یافت. تلقیح خاک با باکتری‌ها با حذف مواد آلاینده باعث افزایش وزن اندام‌های هوایی گردید. با افزایش سطح آلودگی غلظت کلروفیل برگ به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. ولی با تلقیح خاک با باکتری و کاهش اثرات منفی آلودگی نفتی و فراهمی نیتروژن برای گیاه غلظت کلروفیل در برگ تازه گیاهان افزایش یافت. با افزایش سطوح آلودگی نفتی میانگین غلظت پرولین در برگ تازه گیاهان به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت و بالاترین غلظت آن (در هر گیاه) در سطح ۸ درصد وزنی نفت خام به‌دست آمد. تلقیح خاک با باکتری در خاک‌های آلوده و غیرآلوده میزان پرولین در برگ گیاهان را افزایش داد. در هر سطح از آلودگی، با تلقیح خاک با باکتری، غلظت پرولین برگ گیاهان افزایش داشت و بالاترین غلظت پرولین در تیمار حاوی بالاترین سطح آلودگی نفتی (۸ درصد وزنی) و تلقیح با باکتری *سودوموناس پوتیدا* اندازه‌گیری شد.

**نتیجه‌گیری:** استقرار گیاه به همراه ریزجانداران می‌تواند به‌عنوان جزء کلیدی استراتژی حذف هیدروکربن‌های نفتی در نظر گرفته شود. ازاین‌رو، این گونه‌های باکتری و گیاه را می‌توان برای زیست‌پالایی خاک‌های آلوده به نفت خام مورداستفاده قرار داد.

***واژه‌های کلیدی:*** آلودگی نفت خام، پرولین، زیست‌پالایی، کلروفیل، گیاه‌پالایی

## مقدمه

خاک یک پیکره طبیعی است که علاوه بر تکمیل چرخه عناصر و تأمین مواد غذایی برای گیاهان، وظیفه تصفیه‌کنندگی آب را نیز عهده دارد. مواد نفتی و مشتقات آن موجبات آلودگی خاک را فراهم آورده و آن را از انجام وظایف خود بازمی‌دارد (۳۳). هیدروکربن‌های نفتی (TPH)[1] شامل: آلکان‌ها (مانند دکان، هگزادکان و غیره)، ایزوآلکان‌ها (مانند فیتین)، سیکلوآلکان‌ها (مانند سیکلوهگزان، دکالین و غیره)، هیدروکربن‌های مونوآروماتیک (مانند بنزن، تولوئن، اتیل بنزن، زایلن و غیره)، هیدروکربن‌های پلی‌آروماتیک (مانند نفتالن، فنانترون، پیرن، بنزوپیرن و غیره) و هیدروکربن‌های هتروسیکل (مانند رزین، آسفالتین و غیره) می‌باشند (۳۲). روش‌های مختلفی برای پاک‌سازی مناطق آلوده به نفت ارائه شده است که روش‌های فیزیکی (سوزاندن، ابزارهای جمع‌کننده و ...)، شیمیایی (استخراج از طریق حلال‌ها و ...) و زیستی (تهویه زیستی، افزایش زیست‌توده میکروبی و ...) را شامل می‌شوند. روش‌های مکانیکی و شیمیایی که جهت حذف آلودگی‌های نفتی استفاده می‌شوند کارایی محدودی دارند و گران می‌باشند (۵۳). یکی از راه‌های ارزان و مقرون‌به‌صرفه، استفاده از ریزموجودات و گیاهان برای حذف و یا کاهش آلودگی نفتی است. گیاه‌پالایی و زیست‌پالایی، فنّاوری ارزان و مؤثر در کنترل آلودگی بوده و قادر به حذف

1- Total petroleum hydrocarbon



www.SID.ir

Archive of SID



طیف وسیعی از آلاینده‌های آلی می‌باشد و به‌دلیل دارا بودن مزیت‌هایی هم‌چون کم‌ترین به‌هم‌خوردگی خاک، حجم کم ضایعات، جذب اشعه خورشید، پایداری خیلی خوب، سادگی کاربرد، امکان استفاده در سطح وسیع و کمک به رشد گیاهان دیگر جهت رفع آلودگی‌ها، موردتوجه خاص قرار گرفته است (٤٧). معیار برای تحمل گیاهان به استرس نفتی روشن نیست و بسیاری از پاسخ‌های فیزیولوژیکی گیاهان تحت تنش‌های محیطی تغییر می‌یابند. محتوای کلروفیل، پروتئین محلول، محتوای پرولین آزاد، بیومس، محتوای مالون دی‌آلدئید (MDA) و فعالیت‌های آنزیمی آنتی‌اکسیدان معمولاً برای ارزیابی تحمل گیاه به تنش‌های محیطی به‌کار می‌رود (١٣ و ١٥). گیاهان متنوعی که پتانسیل گیاه‌پالایی مکان‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی را دارند شناخته شده‌اند. بیش‌تر مطالعات گراس‌ها و لگوم‌ها را با پتانسیل خوب تشخیص داده‌اند زیرا سیستم ریشه‌ای فیبری و گسترده‌ای دارند. سیستم ریشه‌ای گراس‌ها بالاترین سطح ویژه (سطح ریشه در یک مترمکعب از خاک) را نسبت به انواع دیگر گیاهان داشته و در خاک تا عمق سه متری نفوذ می‌کنند (٣٢ و ٣٤). کاربرد توأمان گیاهان و ریزجانداران در بسیاری از موارد بیش‌تر از کاربرد جداگانه هر یک از آن‌ها در پالایش خاک‌های آلوده به مواد نفتی مؤثر می‌باشد؛ زیرا ریزجانداران علاوه بر تجزیه مواد نفتی، از طریق کمک به استقرار گیاهان در خاک و بهبود شرایط رشد آن‌ها و گیاهان نیز با تولید ترشحات ریشه و تغییر تعداد و تنوع میکروب‌ها در ریزوسفر باعث تشدید تجزیه مواد نفتی می‌شوند و درواقع نوعی هم‌افزایی در تجزیه مواد نفتی ایجاد می‌شود (٨). خسروی نوده و همکاران (٢٠١٣) گزارش دادند که عملکرد گیاه چمن نسبت به یونجه در کاهش آلودگی نفتی خاک بهتر بوده است؛ و اعمال تیمار باکتری *سودوموناس پوتیدا* نیز اثر معنی‌داری بر روی میزان کاهش آلودگی نفتی موجود در خاک نسبت به تیمار بدون باکتری نداشته است (٢٥). هوانگ و همکاران (٢٠٠٤) گزارش کردند گیاه‌پالایی آلاینده‌های نفتی با استفاده از گراس‌ها و با تلقیح باکتری‌های مفید مانند *سودوموناس پوتیدا*، *انتروباکتر کلاسیا* و *آزوسپیریلیوم* در خاک افزایش پیدا کرد (٢٠). خان و همکاران (٢٠٠٩) گزارش دادند که در خاک آلوده به پیرن که دارای ٤٢/٥ درصد شن و ١١ درصد رس بود، پس از ١٨ هفته، کاهش پیرن در تیمارهای حاوی گیاه علفی چچم (*ulium multiforum*) و بدون گیاه به‌ترتیب ٥٩–٦٨ درصد و ١٣–١٩ درصد بود (٢٤). لو و همکاران (٢٠٠٩) نیز اثر کشت نوعی گراس را در گیاه‌پالایی خاک‌آلوده به نفت (٨٢٤٧ میلی‌گرم TPH بر کیلوگرم خاک) بررسی و گزارش دادند بعد از گذشت پنج ماه غلظت آلاینده تا ٤٧ درصد در خاک حاوی گیاه و تا ١١ درصد در خاک فاقد گیاه کاهش یافت (٣٠). هاتچیسون و همکاران (٢٠٠١) در آزمایش‌های گلخانه‌ای شش‌ماهه توانستند به‌طور متوسط ٤٩ درصد کل هیدروکربن‌های نفتی را در خاک‌های آلوده مورد تجزیه قرار دهند. آن‌ها بیش‌ترین میزان تجزیه ترکیبات آلی را در ریزوسفر گیاه مرغ پنجه‌ای (*Cynodon dactylon*)، ٨٠ درصد و در تال‌فسکیو (*Festuca arundinacea*)، ٦٢ درصد گزارش نمودند و به‌طورکلی تخریب کل هیدروکربن‌های نفتی در حضور گیاه ٧/١ برابر تیمار شاهد بود (٢١). درزمینه پاک‌سازی زیستی، لی و گیبسون (١٩٩٦) طی پژوهش‌های خود تأثیر مثبت حضور باکترهای جنس *سودوموناس* را در زدودن آلاینده‌های آلی در خاک گزارش کرده‌اند (٢٦). ریزجانداران تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی جلبک‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌ها هستند. آن‌ها ترکیبات آروماتیک را به ترکیبات ساده تبدیل می‌کنند و محصول نهایی آن‌ها آب و دی‌اکسیدکربن (در شرایط هوازی) و متان (در شرایط بی‌هوازی)



www.SID.ir

Archive of SID



است. ظرفیت بالای آنزیمی به ریزجانداران این اجازه را می‌دهد که هیدروکربن‌های پیچیده را تجزیه کنند (۵۲). ساسانی و همکاران (۲۰۱٦) نشان دادند که *باسیلوس* جداشده از رسوبات مصب رودخانه بابل‌رود، پتانسیل و قدرت تجزیه آنتراسن را دارا بوده و در شرایط بهینه از نظر pH و دما قادر به حذف بیش از ٤٠ درصد از آنتراسن در محیط کشت آزمایشگاهی می‌باشد (٤٥). بسکسکی و همکاران (۲۰۱۱) گزارش دادند که حذف هیدروکربن‌های نفتی در خاک با تلقیح خاک با باکتری *C. catenulate* CM1 برابر با ٨٤ درصد بود و در خاک بدون تلقیح خاک با باکتری برابر با ٤٨ درصد بود؛ و تلقیح مجدد با ریزجانداران جداسازی‌شده از خاک‌های آلوده به مازوت به همراه فراهمی عناصر غذایی، میزان هیدروکربن‌های نفتی را از ۵/۲ گرم در کیلوگرم خاک به ۰/۳ گرم در کیلوگرم خاک رساند (۹). انریکه و همکاران (۲۰۱۱) گزارش دادند که تلقیح خاک با دو باکتری *Bacillus cereus* PY5 و *Bacillus megaterium* PY6 آلودگی پیرین را به‌ترتیب حدود ٦۵/۸ درصد و ۳۳/۷ درصد کاهش داد (۱۸). میشرا و همکاران (۲۰۰۱) گزارش دادند که درصد حذف آلودگی نفتی در تیمارهای تلقیح خاک با باکتری‌های *A. baumannii* S30 و *B. cepacia* به‌ترتیب ۹۲ درصد و ۸۹ درصد بود. در حالی‌که درصد حذف آلودگی نفتی در تیمار شاهد ١٤ درصد بود (٣٦).

در کشور نفت‌خیزی مانند ایران پیامدهای مخرب زیست‌محیطی ناشی از استحصال و پالایش نفت، باعث آلودگی بخش‌هایی از منابع خاک و آب به‌خصوص در جنوب کشور به هیدروکربن‌های نفتی شده است. در استان هرمزگان به‌دلیل وجود منابع سرشار نفت و گاز و توسعه روزافزون صنایع مختلف ازجمله صنایع فولاد و پتروشیمی مشکلات متنوع زیست‌محیطی مانند آلودگی هوا و منابع آب‌وخاک در نقاط مختلف این استان بروز کرده است. بنابراین اتخاذ یک استراتژی صحیح جهت از بین بردن این مشکل و دست‌یابی به توسعه پایدار در این زمینه ضروری است. به همین دلیل هدف این پژوهش بررسی اثر منفرد و تلفیقی چندین سیستم زیستی پاک‌سازی هیدروکربن‌های خاک‌های آلوده و یافتن گیاهان اصلاح‌کننده با خاصیت زیست‌پالایی به‌عنوان راهی عملی و پایدار برای استفاده در خاک‌های آلوده به‌منظور حذف یا کاهش هیدروکربن‌های نفتی در خاک است.

## مواد و روش‌ها

جهت انجام این آزمایش، نمونه خاکی از یک منطقه غیرآلوده از باغو واقع در شرق بندرعباس (عرض جغرافیایی "۳۹/۵ ´۱۵ °۲۷ شمالی و طول جغرافیایی "۳۰/۱ ´۲٤ °٥٦ شرقی) از عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متری تهیه شد و پس از خشک کردن خاک در هوا و عبور دادن از الک دو میلی‌متری برخی از ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن ازجمله بافت خاک به‌روش هیدرومتری (۱۰)، ماده آلی به روش اکسیداسیون مرطوب (٤٨)، قابلیت هدایت الکتریکی در عصاره اشباع به‌وسیله هدایت‌سنج الکتریکی، اسیدیته در خمیر اشباع به‌وسیله pHمتر، ظرفیت تبادل کاتیونی خاک به‌روش استات سدیم (۱۲)، کربنات کلسیم معادل به‌روش خنثی‌سازی توسط اسید کلریدریک (۱)، نیتروژن کل به روش کجلدال (۱۱)، پتاسیم توسط عصاره‌گیری استات آمونیوم نرمال (۱۷) و فسفر قابل‌استفاده توسط عصاره‌گیری بی‌کربنات سدیم (۳۸) تعیین شد. ضمناً عناصر کم‌مصرف با DTPA عصاره‌گیری (۲۹) و غلظت آن‌ها به‌وسیله دستگاه جذب اتمی تعیین گردید.

در مطالعات گیاه‌پالایی، گیاهان باید به‌گونه‌ای انتخاب شوند که از حداکثر جوانه‌زنی، رشد، توسعه و



www.SID.ir

Archive of SID



سطح ویژه ریشه برخوردار باشند و نسبت به شرایط خاک منطقه سازگار باشند و امکان تکمیل دوره رشد آن‌ها در شرایط آلودگی وجود داشته باشد. گونه‌های گراس مانند گیاه سورگوم و جو تراکم ریشه بالایی دارند؛ و علاوه بر توانایی رشد و سازش با شرایط اقلیمی مختلف توانایی حذف آلاینده‌های آلی ناشی از ترکیبات نفتی را نیز به‌خوبی دارند (۳۲). چمن جزو تیره گندمیان محسوب شده و به‌عنوان گیاه مؤثر در گیاه‌پالایی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی پیشنهاد شده است. چمن گیاه علفی بوده و دارای سیستم ریشه‌ای فیبری است به تعامل جامعه میکروبی و آلاینده کمک می‌کند (٤٩). در این پژوهش از باکتری‌های *سودوموناس پوتیدا*[1] و *آزوسپریلیوم براسیلنس*[2] (محرک رشد گیاه) استفاده شد. از دلایل اصلی انتخاب این باکتری‌ها توانایی آن‌ها در افزایش آزادسازی ترشحات ترکیبات آلی ساده توسط ریشه‌های گیاهان و هم‌چنین پتانسیل مصرف هیدروکربن‌های نفتی است (٤٣).

این پژوهش به‌صورت یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در گلخانه اجرا شد. فاکتورهای موردبررسی شامل سطوح آلودگی خاک به نفت (صفر، ٤ و ٨ درصد وزنی) (٦)، نوع گونه گیاهی مورداستفاده در گیاه‌پالایی (بدون گیاه، برموداگراس (*Cynodon dactylon*)، سورگوم (*Sorghum bicolor*) و جو (*Hordeum vulgare*)) و تیمار باکتری غیربومی (بدون باکتری، *سودوموناس پوتیدا* و *آزوسپریلیوم براسیلنس*) بودند که در سه تکرار اعمال گردیدند. باکتری‌های موردنظر از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. ابتدا هر کدام از این باکتری‌ها در محیط کشت نوترینت آگار کشت شدند. سپس با شرایط کاملاً استریل کلنی‌های مربوط به هر کدام از باکتری‌ها برداشته و به‌طور جداگانه، به محیط مایع نوترینت براث تلقیح شد؛ و پس از ٤٨ ساعت تعداد باکتری‌ها بر اساس روش $OD_{600}$ و جدول مک فارلند تخمین زده شد و در نهایت باکتری‌ها در سوسپانسیون جهت حصول تعداد $10^8$ سلول در گرم خاک به گلدان‌ها اسپری و کاملاً مخلوط شد تا باکتری‌ها در خاک به‌صورت یکنواخت پخش شدند و ۱۰ روز برای سازگاری باکتری‌ها در تیمارهای نفتی در نظر گرفته شد. مجدداً خاک گلدان‌ها کاملاً مخلوط شد تا شرایط رطوبتی و محتوای اکسیژن کاملاً یکسان باشد. برای انجام آزمایش نمونه‌های پنج کیلویی خاک به‌صورت مصنوعی و با مقادیر مختلف نفت خام آلوده و در گلدان‌های پلاستیکی ریخته شدند. پس از آلوده نمودن خاک با سطوح مختلف نفتی، به‌مدت شش هفته اجازه می‌دهیم که ترکیبات فرار نفتی از خاک خارج شوند و قسمتی از ترکیبات نفتی جذب سطحی ذرات خاک شوند (٦). سپس این خاک‌ها با گونه‌های مختلف باکتری (دو گونه غیربومی) با تراکم $10^8$ سلول در هر گرم خاک تلقیح شدند (٥١). با توجه به نتایج آزمون خاک نیتروژن به‌صورت اوره، فسفر به‌صورت مونوپتاسیم‌فسفات، آهن از منبع کلات آهن FeEDDHA، روی، منگنز و مس از منبع سولفات به‌ترتیب به‌میزان ۱۵۰، ۵۰، ۱۰، ۱۰، ۵ و ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک به‌طور یکنواخت به تمام گلدان‌ها اضافه گردید؛ و سپس در آن‌ها گونه‌های گیاهی مختلف کاشته شدند. در پایان دوره آزمایش (۹۰ روز) علاوه بر اندازه‌گیری وزن خشک گیاه، خاک گلدان‌ها عصاره‌گیری و غلظت کل هیدروکربن‌های باقی‌مانده در آن‌ها اندازه‌گیری گردید. برای اندازه‌گیری غلظت کل هیدروکربن‌های نفتی در خاک، این ترکیبات با حلال‌های هگزان و دی‌کلرومتان با استفاده از دستگاه سوکسله عصاره‌گیری شدند (١٤). برای این منظور نمونه خاک ۲۰ گرم توزین و داخل کاغذ مخصوصی

1- *Pseudomonas putida*
2- *Azosprillum brasilense*



www.SID.ir

Archive of SID



به نام تیمبل قرار داده شد. پرزهای این نوع کاغذ به شکلی است که حلال از آن عبور می‌کند، ولی ذرات خاک از آن عبور نمی‌نمایند. تیمبل پس از آماده شدن در سوکسله قرار داده شد و به‌ازای ۲۰ گرم خاک توزین شده، ۱۲۵ میلی‌لیتر از هر حلال به فلاکس دستگاه اضافه گردید. با تنظیم دستگاه دمای دستگاه ۷۰ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد، ترکیبات نفتی خاک عصاره‌گیری شدند. سپس دستگاه خاموش و مایع داخل فلاکس از کاغذ صافی واتمن ٤٢ عبور داده شد. از استاندارد نفت خام در غلظت‌های مختلف تهیه کرده و میزان جذب آن‌ها توسط دستگاه قرائت توسط دستگاه UVF (اسپکترو فوتومتر فلورسانس) با طول‌موج نشر ٣٦٠ نانومتر و طول‌موج تحریک ٣١٠ نانومتر قرائت شد و منحنی کالیبراسیون رسم گردید؛ و بر این اساس غلظت کل هیدروکربن‌های باقی‌مانده در هر کدام از تیمارها اندازه‌گیری شد (۳۷)؛ و طی مدت ۹۰ روز رطوبت آن‌ها از طریق توزین گلدان‌ها و تأمین کسری رطوبت موردنیاز، در حد ٦٠-٧٠ درصد ظرفیت مزرعه نگه‌داشته شد. در انتهای آزمایش غلظت کل هیدروکربن‌های نفتی در خاک اندازه‌گیری گردیدند (۳۷)، و میزان کلروفیل در برگ تازه گیاه با روش آرنون (۳) و کاربرد استن ۸۰ درصد اندازه‌گیری گردید. جهت اندازه‌گیری پرولین به روش بیتز و همکاران (۷) و از اسید سولفوسالسیلیک به‌عنوان عصاره‌گیر و از تولوئن به عنوان ماده کمپلکس‌دهنده استفاده شد.

داده‌های جمع‌آوری‌شده در این پژوهش با استفاده از نرم‌افزارهای Excel و SAS مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت و جدول‌های تجزیه واریانس تشکیل شد. هم‌چنین مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد انجام گرفت.

**جدول ۱- برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد مطالعه.**

**Table 1. Some of the physicochemical characteristics of the soil in the study area.**

| پتاسیم قابل استفاده (Available K) | فسفر قابل استفاده (Available P) | منگنز قابل استفاده (Available Mn) | روی قابل استفاده (Available Zn) | مس قابل استفاده (Available Cu) | آهن قابل استفاده (Available Fe) | نیتروژن کل (Total N) | EC | pH | CEC | CCE | OC | سیلت (Silt) | شن (Sand) | رس (Clay) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| mg kg$^{-1}$ | | | | | | % | dS m$^{-1}$ | - | cmol$_+$ kg$^{-1}$ | | | % | | |
| 380 | 6.5 | 4.9 | 0.94 | 1.83 | 5.8 | 0.033 | 1.1 | 7.4 | 10.1 | 46 | 0.01 | 41 | 37 | 22 |

## نتایج و بحث

**تأثیر گیاه‌پالایی و زیست‌افزونی بر حذف نفت خام:** جدول تجزیه واریانس نشان داد که تأثیر گیاه‌پالایی، زیست‌پالایی و کاربرد توأم آن‌ها در سطوح مختلف آلودگی نفتی بر حذف ترکیبات نفتی معنی‌دار است (جدول ۲). همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود در هر سطح آلودگی نفت خام با کاشت گیاهان سورگوم، جو و چمن درصد حذف نفت خام در خاک نسبت به تیمار بدون کشت گیاه به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و بیش‌ترین درصد حذف نفت خام در خاک به‌ترتیب مربوط به گیاهان سورگوم، چمن و جو بود. می‌توان علت بالا بودن



www.SID.ir

Archive of SID



تجزیه و حذف مواد نفتی در خاک‌های کشت‌شده نسبت به خاک شاهد را این‌گونه تفسیر کرد که شرایط خاک در حضور گیاه نسبت به خاک‌های بدون کشت مناسب‌تر است؛ بنابراین رشد، جمعیت و فعالیت میکروبی در گلدان‌های تحت کشت افزایش می‌یابد. با رشد ریشه گیاه منافذ خاک بزرگ‌تر می‌شوند و اکسیژن لازم برای واکنش اکسیداسیون به سطوح پایین‌تر خاک انتقال می‌یابد. همچنین ریشه گیاهان ترکیبات آلی و آنزیم‌هایی ترشح می‌کنند که ازیک‌طرف به حذف مواد نفتی کمک می‌کند و از طرف دیگر بستر مناسبی برای رشد و فعالیت ریزجانداران فراهم می‌کند (٤٤). تفاوت بین گیاهان در حذف نفت خام در خاک می‌تواند مربوط به تفاوت در سیستم ریشه‌ای گیاهان، ترشحات ریشه و آنزیم‌ها تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی باشد (۳۲ و ۳٤). ریزجانداران در حضور منابع کربن، آنزیم‌هایی تولید کرده که مسئول حمله به مولکول‌های هیدروکربن می‌باشند. کارایی فرآیند گیاه‌پالایی به‌میزان زیادی بستگی به حضور و فعالیت جامعه میکروبی وابسته به گیاه دارد (۲). پژوهش‌ها نشان داده است که حذف هیدروکربن‌های آروماتیک در خاک‌های تحت کشت دو برابر خاک‌های بایر یا بدون کشت بود (۲). شکل ۲ نشان می‌دهد که در هر سطح آلودگی نفتی در خاک با تلقیح خاک با باکتری درصد حذف نفت خام در خاک نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری یافت و هم‌چنین کارایی تلقیح خاک با باکتری در حذف نفت خام در سطوح پایین آلودگی نفت خام در خاک (٤ درصد) بیش‌تر از سطوح بالای آلودگی نفت خام در خاک (۸ درصد) بود. در هر سطح آلودگی، تلقیح خاک با باکتری *سودوموناس پوتیدا* بیش‌ترین کارایی در درصد حذف نفت خام در خاک داشت (شکل ۲). اختلاف بین این دو باکتری در تجزیه نفت خام می‌تواند به‌دلیل تفاوت در توانایی آنزیم‌های تجزیه‌کننده نفت خام و مسیرهای تجزیه‌ای باشد که توسط ریزجانداران مختلف استفاده می‌شود (۳۹). ریزجانداران قادرند از هیدروکربن‌های نفتی به‌عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کنند و این ریزجانداران به‌طور وسیعی در طبیعت وجود دارند. هم‌چنین از دلایل حذف بیش‌تر نفت خام در حضور تیمار باکتری می‌توان گفت، اضافه شدن باکتری‌ها باعث افزایش حلالیت بخش غیرقابل‌دسترس آلاینده‌ها به‌واسطه ترشح بیوسورفکتانت‌ها و بالطبع آن افزایش تجزیه هیدروکربن نفتی کل می‌شود. برهمکنش گیاه و تلقیح خاک با باکتری اهمیت زیادی در کارایی گیاه در حذف آلودگی نفتی دارد. همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود کاشت گیاه و تلقیح باکتری‌ها درصد حذف ترکیبات نفتی را افزایش داده است. بیش‌ترین میزان کاهش نفت خام در تیمار کاشت سورگوم تلقیح شده با *سودوموناس پوتیدا* بود و کم‌ترین میزان کاهش مربوط به تیمار شاهد بود. همان‌طور که در جدول ۳ دیده می‌شود تلقیح خاک با باکتری در تیمارهای حاوی و فاقد گیاه سبب افزایش حذف نفت خام از خاک شد. پس تلقیح باکتری به خاک‌آلوده فرایند حذف نفت خام از خاک را تسریع می‌کند. علت بالا بودن تجزیه و حذف مواد نفتی در خاک‌های کشت‌شده نسبت به خاک شاهد فعالیت‌های توأم شیمیایی، بیولوژیکی و فیزیکی می‌باشد. درصورتی‌که در خاک‌های شاهد تجزیه ترکیبات نفتی تنها به‌دلیل تصعید[1] و تجزیه نوری است (٤١). در هر سطح آلودگی نفتی در خاک، تجزیه ترکیبات نفتی در خاک با کاربرد توأم گیاه و تلقیح خاک با باکتری نسبت به کاشت گیاه و تلقیح خاک با باکتری به‌تنهایی مؤثرتر است (جدول ۳).

1- Volatilization



www.SID.ir

Archive of SID



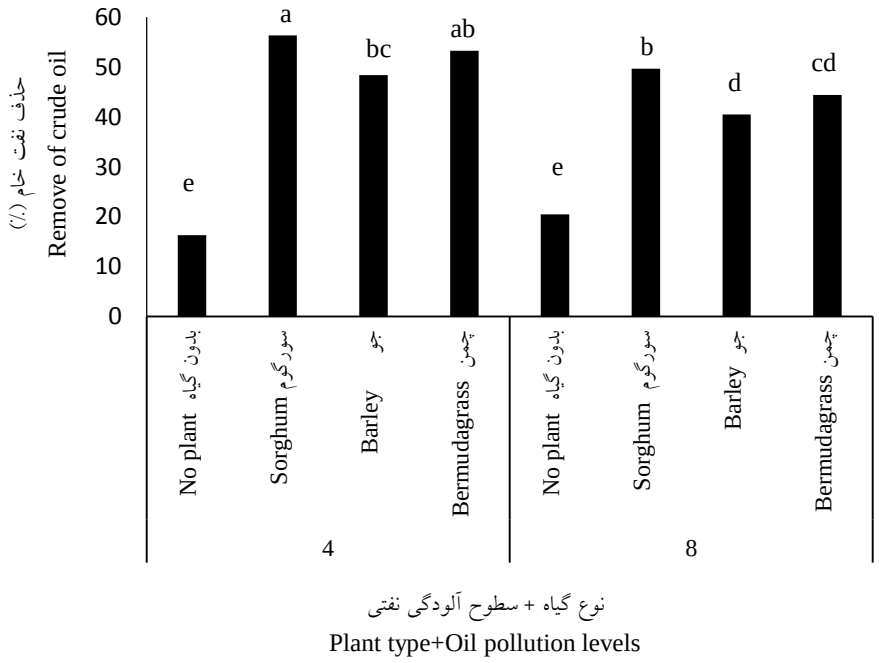
جدول ۲- تجزیه واریانس درصد حذف نفت خام در خاک.

**Table 2. Variance analysis of removal percentage of crude oil in the soil.**

| میانگین مربعات Mean square | درجه آزادی Degree of freedom | منابع تغییر Source |
|---|---|---|
| درصد حذف نفت خام Percentage of oil crude removal | | |
| 90.78* | 2 | نفت خام * باکتری Oil crude*bacteria |
| 164.56** | 3 | نفت خام * گیاه Oil crude*plant |
| 95.43** | 6 | باکتری * گیاه Bacteria*plant |
| 141.11** | 6 | نفت خام * باکتری * گیاه Oil crude*bacteria*plant |
| 35.39 | 48 | خطا Error |

* و ** به‌ترتیب در سطح پنج و یک درصد معنی‌دار است.

* and ** indicate significant at 5 and 1 % probability level, respectively.




شکل ۱- تأثیر گیاه‌پالایی در حذف آلودگی نفتی در سطوح مختلف آلودگی نفتی.

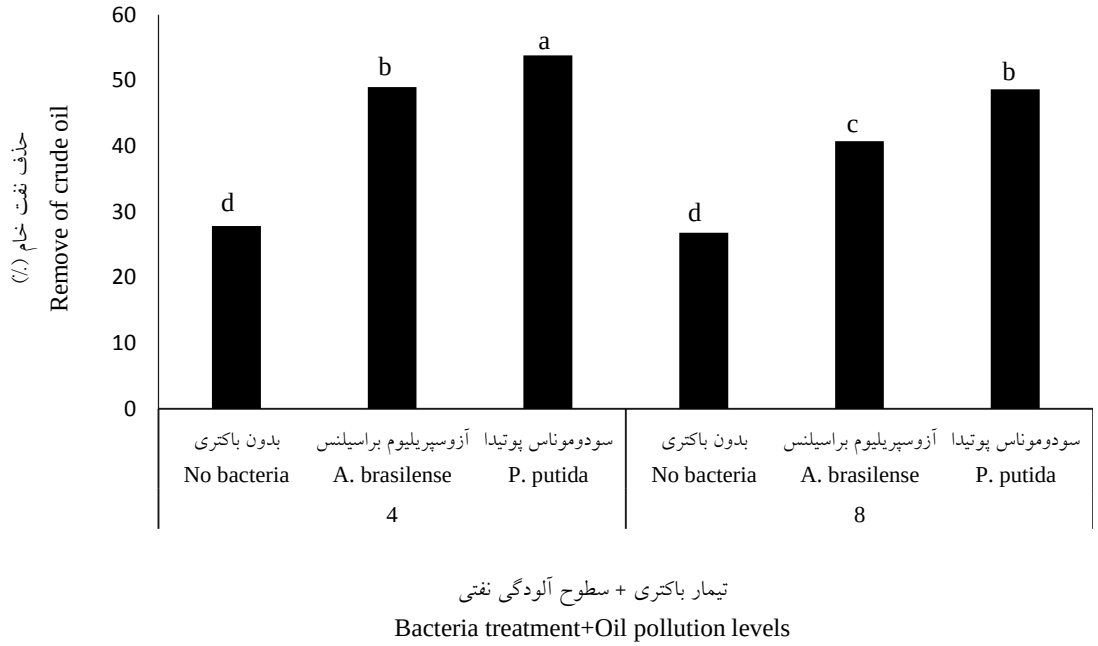
**Figure 1. Effect of phytoremediation on removal of oil pollution in different levels of oil pollution.**



www.SID.ir

Archive of SID






**شکل ۲- تأثیر زیست‌پالایی در حذف آلودگی نفتی در سطوح مختلف آلودگی نفتی در خاک.**

**Figure 2. Effect of bioremediation on removal of oil pollution in different levels of oil pollution in soil.**

پالمروس و همکاران (۲۰۰۲) کاهش ٤٠ و ۹۸ درصدی غلظت آلاینده‌های نفتی در حضور گیاهان علفی به‌ترتیب در تیمار بدون تلقیح شده میکروبی و تیمار تلقیح میکروبی پس از یک دوره آزمایش ٦٠ روزه گزارش نمودند (٤٠). پنگ و همکاران (۲۰۰۹) پژوهشی بر روی سه خاک‌آلوده به مواد نفتی انجام دادند. آن‌ها گزارش دادند که کارایی گیاه *Mirabilis Jalapa* L. در حذف آلودگی نفتی در یک دوره رشد ۱۲۷ روزه در سه خاک حدود ٤١/٦١ تا ٦٣/٢٠ درصد بود درحالی‌که میزان حذف در خاک شاهد یا بدون گیاه حدود ۱۹/۷۵ تا ۳٦/۹۰ درصد بود و این نشان می‌دهد که در خاک‌های موردمطالعه حذف ترکیبات نفتی در تیمارهای حاوی گیاه حدود ۱/٦۷ تا ۲/۱۳ برابر تیمار شاهد است (٤١). جینگ و همکاران (۲۰۰۸) کارایی سه گونه علفی، *namely Pannicum*، *Eleusine indica* (L.) *Gaerth* و *Tall Fescue* بر حذف آلودگی نفتی در یک دوره ۱۵۰ روزه در خاک را بررسی کردند و مشاهده نمودند که با کشت این گیاهان حذف آلودگی نفتی در خاک افزایش یافت و حذف آلودگی نفتی در خاک‌های کشت شده ۳ تا ٤ برابر خاک‌های شاهد (بدون گیاه) بود (۲۲). ویلتس و همکاران (۱۹۹۸) نیز دریافتند که گونه‌های مختلف یونجه اثری مثبت بر کاهش غلظت آلاینده‌های ناشی از نفت خام در خاک دارند. طوری‌که در حضور این گیاهان، غلظت آلاینده‌های نفتی حدود ۳۳ تا ٥٦ درصد نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت (٥٠).



www.SID.ir

Archive of SID



جدول ۳- مقایسه میانگین اثرات متقابل باکتری، آلودگی نفتی و کشت گیاه بر درصد حذف نفت خام در خاک.

**Table 3. Mean comparison of interaction effects of bacteria, oil pollution and plant on the percentage of removal of crude oil in soil.**

| نوع گیاه<br>Plant type | تیمار باکتری<br>Bacteria treatment | سطوح نفت خام (٪)<br>Levels of crude oil (%) | حذف نفت خام (٪)<br>Remove of crude oil (%) |
|---|---|---|---|
| بدون گیاه (No plant) | بدون باکتری (No bacteria) | 4 | $9.00^{j}$ |
| بدون گیاه (No plant) | بدون باکتری (No bacteria) | 8 | $5.00^{j}$ |
| سورگوم (Sorghum) | بدون باکتری (No bacteria) | 4 | $38.58^{efg}$ |
| سورگوم (Sorghum) | بدون باکتری (No bacteria) | 8 | $32.80^{fg}$ |
| جو (Barley) | بدون باکتری (No bacteria) | 4 | $28.49^{hi}$ |
| جو (Barley) | بدون باکتری (No bacteria) | 8 | $36.14^{fgh}$ |
| چمن (Bermudagrass) | بدون باکتری (No bacteria) | 4 | $35.32^{fgh}$ |
| چمن (Bermudagrass) | بدون باکتری (No bacteria) | 8 | $33.33^{fgh}$ |
| بدون گیاه (No plant) | *آزوسپریلیوم براسیلنس* (*A. brasilense*) | 4 | $19.16^{i}$ |
| بدون گیاه (No plant) | *آزوسپریلیوم براسیلنس* (*A. brasilense*) | 8 | $23.35^{i}$ |
| سورگوم (Sorghum) | *آزوسپریلیوم براسیلنس* (*A. brasilense*) | 4 | $63.01^{ab}$ |
| سورگوم (Sorghum) | *آزوسپریلیوم براسیلنس* (*A. brasilense*) | 8 | $50.59^{cd}$ |
| جو (Barley) | *آزوسپریلیوم براسیلنس* (*A. brasilense*) | 4 | $57.20^{ab}$ |
| جو (Barley) | *آزوسپریلیوم براسیلنس* (*A. brasilense*) | 8 | $46.10^{de}$ |
| چمن (Bermudagrass) | *آزوسپریلیوم براسیلنس* (*A. brasilense*) | 4 | $56.64^{bc}$ |
| چمن (Bermudagrass) | *آزوسپریلیوم براسیلنس* (*A. brasilense*) | 8 | $42.95^{def}$ |
| بدون گیاه (No plant) | *سودوموناس پوتیدا* (*P. putida*) | 4 | $20.69^{i}$ |
| بدون گیاه (No plant) | *سودوموناس پوتیدا* (*P. putida*) | 8 | $32.94^{gh}$ |
| سورگوم (Sorghum) | *سودوموناس پوتیدا* (*P. putida*) | 4 | $67.35^{a}$ |
| سورگوم (Sorghum) | *سودوموناس پوتیدا* (*P. putida*) | 8 | $65.53^{ab}$ |
| جو (Barley) | *سودوموناس پوتیدا* (*P. putida*) | 4 | $59.43^{abc}$ |
| جو (Barley) | *سودوموناس پوتیدا* (*P. putida*) | 8 | $39.13^{efg}$ |
| چمن (Bermudagrass) | *سودوموناس پوتیدا* (*P. putida*) | 4 | $67.81^{a}$ |
| چمن (Bermudagrass) | *سودوموناس پوتیدا* (*P. putida*) | 8 | $56.93^{bc}$ |

حروف مشابه در ستون، عدم معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

The same letters in column are insignificant at P<0.05.

**تأثیر سطوح آلودگی خاک به نفت خام بر وزن خشک اندام هوایی گیاهان موردمطالعه:** جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثرات نوع گیاه، نوع باکتری و اثر متقابل آن‌ها در سطوح مختلف نفت بر وزن خشک گیاهان موردمطالعه معنی‌دار بود (جدول ٤). جدول ۵ نشان می‌دهد که حضور آلاینده‌های نفتی



www.SID.ir

Archive of SID



در خاک موجب کاهش وزن خشک اندام هوایی گیاهان شد و میزان کاهش برای جو قابل‌توجه بود. پایداری سورگوم و برموداگراس نسبت به جو در برابر آثار سمی آلاینده‌های نفتی در خاک بالاتر بود. تفاوت در کاهش وزن خشک بین گیاهان می‌تواند مربوط به اختلاف کارایی آن‌ها در حذف نفت خام از خاک و توانایی در توسعه و گسترش ریشه در کل حجم خاک‌آلوده باشد. در سطوح بالای نفت سمیت ناشی از غلظت زیاد برخی عناصر و وجود ترکیبات سمی مانند هیدروکربن‌های نفتی و آروماتیک چندحلقه‌ای باعث کاهش معنی‌داری عملکرد گیاهان می‌شود. به‌نظر می‌رسد که به سبب حضور آلاینده‌های نفتی در خاک و ویژگی آب‌گریزی این ترکیبات، قابلیت دسترسی رطوبت و عناصر غذایی برای ریشه این گیاهان کاهش‌یافته و بنابراین سبب محدودیت رشد و استقرار ریشه در خاک‌های آلوده شده است (٤٦). هم‌چنین کاهش رشد گیاه می‌تواند ناشی از ترکیبات سمی نفت خام باشد که توسط گیاه جذب شده و با کاهش یکپارچگی غشاء سلولی باعث مرگ سلول می‌شود (۳۳). جدول ۵ نشان می‌دهد در هر سطح از آلودگی نفتی و در هر گیاه، با تلقیح خاک با باکتری وزن خشک بخش هوایی گیاهان افزایش یافت؛ که نشان می‌دهد تلقیح خاک با باکتری‌ها سبب کاهش اثرات منفی نفت خام بر رشد گیاهان شده است. به‌عنوان‌مثال در گیاه سورگوم با تلقیح خاک با باکتری *سودوموناس پوتیدا*، وزن خشک گیاه در سطوح آلودگی ٤ درصد و ۸ درصد به‌ترتیب حدود ۱۰ درصد و ۲۰ درصد نسبت به شاهد (تیمار بدون تلقیح خاک با باکتری و بدون آلودگی نفتی) کاهش یافت. درحالی‌که در همین گیاه بدون تلقیح خاک با باکتری در سطوح ٤ و ۸ درصد آلودگی نفتی، وزن خشک به‌ترتیب حدود ۵۷ و ۷۲ درصد کاهش نشان داد. همچنین گیاه سورگوم در سطح آلودگی نفتی ٤ درصد با تلقیح خاک با باکتری *سودوموناس پوتیدا* و *آزوسپریلیوم براسیلنس*، وزن خشک سورگوم به‌ترتیب حدود ۲/۱۱ برابر و ۱/۸۲ برابر نسبت به تیمار بدون باکتری افزایش یافت و در همین سطح آلودگی نفتی، وزن خشک گیاه برموداگراس به‌ترتیب حدود ۷۰ درصد و ٦۹ درصد نسبت به تیمار بدون باکتری افزایش نشان داد. اختلاف بین باکتری‌ها در کاهش اثرات سمی نفت بر وزن خشک گیاه می‌تواند مربوط به تفاوت قابلیت آن‌ها در حذف نفت خام از خاک و سازگاری آن‌ها با خاک‌های آلوده در جهت بهبود شرایط رشد گیاهان باشد. در رابطه با اثر مثبت باکتری‌ها بر وزن زی‌توده اندام‌های هوایی گیاهان نیز می‌توان چنین بیان نمود که باکتری با بهبود وضعیت آبی گیاه و افزایش محتوای کلروفیل برگ‌ها و همچنین به‌واسطه تثبیت زیستی نیتروژن، محلول کردن فسفات نامحلول خاک و تولید هورمون‌های گیاهی می‌تواند جذب بیش‌تر مواد غذایی توسط گیاه را تحریک کرده و منجر به بهبود فرآیند فتوسنتز و در نتیجه افزایش رشد و عملکرد گیاه شود (۱۹ و ۲۰). باسیلیو و همکاران (۲۰۰٤) گزارش کردند که استفاده از *Azospirillum lipoferum gfp-tagged* وزن خشک ریشه و برگ و ارتفاع گیاه در گندم را افزایش داد؛ آن‌ها یکی از دلایل افزایش عملکرد این گیاهان را به افزایش جذب آب در گیاه نسبت دادند (٤). نتایج این پژوهش نشان داد که تلقیح خاک با باکتری، رشد گیاهان را در خاک‌آلوده بیش‌تر از خاک غیرآلوده افزایش داد. چون باکتری‌ها هم‌پتانسیل تجزیه‌کنندگی نفت و هم‌پتانسیل تحریک رشد گیاه را داشتند به همین دلیل اثر آن‌ها بر رشد گیاه در خاک غیرآلوده نیز معنی‌دار بوده، به‌نظر می‌رسد نقش عمده



www.SID.ir

Archive of SID



باکتری‌ها در بهبود رشد گیاه در خاک‌آلوده و غیرآلوده، به‌ترتیب کاهش اثر سمیت و تنش ناشی از آلودگی نفتی و هم‌چنین تحریک مستقیم رشد گیاه باشد. هم‌چنین به‌نظر می‌رسد که نیاز گیاه و باکتری‌ها به یکدیگر در خاک‌آلوده بیش‌تر از خاک غیرآلوده می‌باشد. از طرف دیگر هوانگ و همکاران (۲۰۰٤) عنوان کردند که باکتری‌های محرک رشد گیاه در ناحیه ریشه با سنتز ACC- دآمیناز و کاهش سطح اتیلن در گیاه باعث افزایش قدرت جوانه‌زنی، جلوگیری از کاهش رشد ریشه و افزایش قدرت بقای گیاه تحت تنش می‌گردند (۲۰).

باروتیا و همکاران (۲۰۱۱) گزارش دادند که آلودگی خاک با گازوئیل (۱۲۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن خشک خاک) وزن خشک اندام هوایی شبدر سفید و چچم دائمی را به‌ترتیب ۷۸ درصد و ۲۰ درصد نسبت به شاهد کاهش داد (۵). لی و همکاران (۲۰۰۸) مشاهده کردند که در بالاترین سطح آلودگی خاک به هیدروکربن‌های نفتی (٤۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) وزن خشک اندام هوایی برنج ۲۵ درصد نسبت به تیمار بدون آلودگی کاهش یافت و اما در همین سطح آلودگی خاک، با تلقیح خاک با باکتری *Acinetobacter sp.* وزن خشک گیاه برنج ۵۵ درصد نسبت به تیمار بدون تلقیح خاک با باکتری افزایش یافت (۲۸). باکتری‌های محرک رشد گیاه به حفظ کلروفیل برگ، افزایش آب بافت و رشد ریشه کمک نموده و باعث فراهم آمدن زیست‌توده انبوه جهت گیاه‌پالایی می‌گردند (۲۰). به گزارش میشرا و ناتیال (۲۰۰۹) طول ریشه و ساقه و وزن خشک گیاه نخود در خاک‌آلوده به نفت کاهش یافت ولی افزودن مایه تلقیح به خاک‌آلوده باعث بهبود وضعیت رشد گیاه گردید (۳٦).

**جدول ٤- تجزیه واریانس وزن خشک، غلظت کلروفیل و غلظت پرولین.**

**Table 4. Analysis of variance dry weight, chlorophyll concentration and proline concentration.**

| منابع تغییر Source | درجه آزادی Degree of freedom | میانگین مربعات Mean square | | |
|---|---|---|---|---|
| | | وزن خشک Dry weight | غلظت کلروفیل Chlorophyll concentration | غلظت پرولین Proline concentration |
| نفت خام * باکتری Crude oil*bacteria | 4 | 21.06** | 0.08** | 0.19** |
| نفت خام * گیاه Crude oil *plant | 4 | 978.59** | 0.02** | 0.24** |
| باکتری * گیاه Bacteria*plant | 4 | 97.09** | 0.15** | 0.016** |
| نفت خام * باکتری * گیاه Crude oil *bacteria*plant | 8 | 20.47** | 0.12** | 0.087** |
| خطا Error | 54 | 3.58 | 0.16 | 0.05 |

* و ** به‌ترتیب در سطح پنج و یک درصد معنی‌دار است.

* and ** indicate significant at 5 and 1 % probability level, respectively.



www.SID.ir

Archive of SID



**جدول ۵- اثر متقابل سطوح مختلف آلودگی نفتی، تلقیح خاک با باکتری و نوع گیاه بر وزن خشک اندام هوایی گیاهان (گرم در گلدان)، غلظت کلروفیل برگ (میلی‌گرم در گرم برگ تازه) و پرولین (میکرومول در گرم برگ تازه).**

**Table 5. Interaction effects of different levels of oil pollution, inoculation of soil with bacteria and plant type on dry weight (g per pot), leaf chlorophyll (mg/g fresh leaves) and proline (micro mol/g fresh leaves) in different plants.**

| غلظت پرولین Proline concentration | غلظت کلروفیل Chlorophyll concentration | وزن خشک dry weight | سطوح نفت خام (٪) Levels of crude oil (%) | تیمار باکتری Bacteria treatment | نوع گیاه Plant type |
|---|---|---|---|---|---|
| 0.41j | 2.04kl | 11.19mn | 0 | بدون باکتری (No bacteria) | جو (Barley) |
| 1.19i | 2.98cd | 23.74jk | 0 | سودوموناس پوتیدا (*p*. putida) | جو (Barley) |
| 0.97i | 2.79def | 20.35l | 0 | آزوسپریلیوم براسیلنس (*A. brasilense*) | جو (Barley) |
| 0.41j | 2.60fgh | 28.79h | 0 | بدون باکتری (No bacteria) | سورگوم (Sorghum) |
| 1.12i | 3.30a | 42.24e | 0 | سودوموناس پوتیدا (*P. putida*) | سورگوم (Sorghum) |
| 0.95i | 3.20ab | 36.45f | 0 | آزوسپریلیوم براسیلنس (*A. brasilense*) | سورگوم (Sorghum) |
| 0.44j | 2.74efg | 63.08c | 0 | بدون باکتری (No bacteria) | چمن (Bermudagrass) |
| 1.12i | 3.04bc | 83.02a | 0 | سودوموناس پوتیدا (*P. putida*) | چمن (Bermudagrass) |
| 1.03i | 2.93cde | 71.99b | 0 | آزوسپریلیوم براسیلنس (*A. brasilense*) | چمن (Bermudagrass) |
| 1.54fg | 1.75mn | 4.04q | 4 | بدون باکتری (No bacteria) | جو (Barley) |
| 2.40e | 1.91lm | 9.29no | 4 | سودوموناس پوتیدا (*P. putida*) | جو (Barley) |
| 2.17e | 1.84lm | 8.64o | 4 | آزوسپریلیوم براسیلنس (*A. brasilense*) | جو (Barley) |
| 1.31ghi | 1.90lm | 12.27m | 4 | بدون باکتری (No bacteria) | سورگوم (Sorghum) |
| 2.32e | 2.82de | 25.91i | 4 | سودوموناس پوتیدا (*P. putida*) | سورگوم (Sorghum) |
| 1.72f | 2.46hi | 22.86k | 4 | آزوسپریلیوم براسیلنس (*A. brasilense*) | سورگوم (Sorghum) |
| 1.05i | 1.85lm | 32.52g | 4 | بدون باکتری (No bacteria) | چمن (Bermudagrass) |
| 2.21e | 2.55gh | 55.32d | 4 | سودوموناس پوتیدا (*P. putida*) | چمن (Bermudagrass) |
| 1.48fgh | 2.26ij | 55.24d | 4 | آزوسپریلیوم براسیلنس (*A. brasilense*) | چمن (Bermudagrass) |
| 2.45e | 1.00o | 3.40q | 8 | بدون باکتری (No bacteria) | جو (Barley) |
| 3.90a | 1.60n | 8.55o | 8 | سودوموناس پوتیدا (*P. putida*) | جو (Barley) |
| 3.40bc | 1.15o | 6.11p | 8 | آزوسپریلیوم براسیلنس (*A. brasilense*) | جو (Barley) |
| 2.47e | 1.03o | 7.92p | 8 | بدون باکتری (No bacteria) | سورگوم (Sorghum) |
| 3.70ab | 1.20jk | 23.04k | 8 | سودوموناس پوتیدا (*P. putida*) | سورگوم (Sorghum) |
| 3.30c | 1.94lm | 19.44l | 8 | آزوسپریلیوم براسیلنس (*A. brasilense*) | سورگوم (Sorghum) |
| 2.85d | 1.13o | 11.44mn | 8 | بدون باکتری (No bacteria) | چمن (Bermudagrass) |
| 3.78a | 1.93lm | 29.23h | 8 | سودوموناس پوتیدا (*P. putida*) | چمن (Bermudagrass) |
| 3.54abc | 1.72mn | 25.23lj | 8 | آزوسپریلیوم براسیلنس (*A. brasilense*) | چمن (Bermudagrass) |

حروف مشابه در ستون، عدم معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

The same letters in column are insignificant at P<0.05.



www.SID.ir

Archive of SID



**تأثیر نفت خام بر میزان کلروفیل برگ تازه گیاه:** جدول تجزیه واریانس نشان داد که تأثیر نوع گیاه، تلقیح خاک با باکتری و کاربرد توأم آن‌ها در سطوح آلودگی خاک به مواد نفتی بر میزان کلروفیل معنی‌دار است (جدول ٤). همان‌طور که در جدول ۵ مشاهده می‌شود میانگین غلظت کلروفیل برگ تازه در هر سه نوع گیاه مورد آزمایش با افزایش سطوح نفتی کاهش یافت. تنش‌های غیرزیستی مانند شوری و آلودگی خاک باعث تولید گونه‌های اکسیژن‌دار فعال می‌شود که می‌تواند باعث تخریب غشا و اکسیداسیون کلروفیل شود (۱۱). همچنین از دلایل دیگر کاهش میزان کلروفیل برگ احتمالاً تغییر مسیر متابولیسم نیتروژن جهت ساخت ترکیب‌هایی مانند پرولین است، که برای تنظیم اسمزی به‌کار می‌رود. همان‌طور که در جدول ۵ مشاهده می‌شود با افزایش سطوح آلودگی نفتی غلظت کلروفیل برگ کاهش یافت اما در هر سطح از آلودگی نفتی در هر گیاه، با تلقیح خاک با باکتری‌ها غلظت کلروفیل برگ افزایش یافت. پس می‌توان گفت تلقیح خاک با باکتری اثرات منفی سطوح نفتی بر این پارامتر را کاهش داده و مقاومت گیاهان را به آلاینده افزایش می‌دهد. مثلاً در گیاه چمن و سورگوم در سطح ۸ درصد آلودگی نفتی در خاک بدون تلقیح خاک با باکتری غلظت کلروفیل برگ به‌ترتیب حدود ۵۹ و ۵۰ درصد نسبت به شاهد کاهش یافت. مطالعه ریشه گیاهان می‌تواند بیانگر تفاوت آسیب‌پذیری گیاهان در مواجه با آلودگی نفت در خاک باشد. علت تفاوت در غلظت کلروفیل گیاهان موردمطالعه می‌تواند مربوط به تفاوت مقاومت گیاهان در برابر تنش آلودگی نفتی در خاک و کارایی آن‌ها در حذف نفت خام از خاک باشد. در سطح ۸ درصد آلودگی نفتی با تلقیح خاک با باکتری *سودوموناس پوتیدا* و *آزوسپریلیوم براسیلنس* غلظت کلروفیل در برگ چمن به‌ترتیب حدود ۲۹ درصد و ۳۸ درصد نسبت به شاهد کاهش یافت. علت اختلاف اثر باکتری‌ها بر غلظت کلروفیل در خاک‌های آلوده به نفت خام می‌تواند مربوط به تفاوت باکتری‌ها در حذف نفت خام از خاک و هم‌چنین در فراهمی عناصر غذایی برای گیاهان و تولید سیدروفور باشد. اثرات مفید باکتری‌های موردمطالعه بر این پارامتر می‌تواند به‌خاطر افزایش توانایی گیاه در حضور باکتری در تغییر ترکیبات نفتی باشد که سبب کاهش سمیت این ترکیبات می‌شود و هم‌چنین مشارکت آن‌ها در افزایش جذب نیتروژن در گیاه و تولید هورمون‌های گیاهی باشد؛ که این عوامل می‌تواند جذب بیش‌تر مواد غذایی ازجمله آهن توسط گیاه را تحریک کرده و منجر به افزایش میزان کلروفیل برگ گیاهان شود (۱۹). به گزارش میشرا و ناتیال (۲۰۰۹) با افزایش غلظت گازوئیل در خاک میزان کلروفیل کل در برگ‌های نخود کاهش یافت اما در حضور مایه تلقیح (*Trichoderma ressei*) مقدار کلروفیل ۵۰ درصد افزایش یافت (۳۵).

پرتیمو-کلارک و آچوبا (۲۰۰۷) گزارش دادند که غلظت کلروفیل از ٤۰۲/۷۰ میلی‌گرم در گرم وزن خشک برگ در تیمار شاهد به ۲٦۸/۳ میلی‌گرم در گرم وزن خشک برگ در تیمار ۲ درصد آلودگی نفتی رسید (٤۲). باروتیا و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که پس از ۲ ماه رشد گیاه شبدر در خاک‌آلوده به مواد نفتی، میزان کلروفیل ۸۱ درصد نسبت به خاک غیرآلوده کاهش پیدا کرد اما در مورد گیاه چچم دائمی هیچ تفاوت معنی‌داری میان گیاهان رشدیافته در خاک‌های آلوده و غیرآلوده از این نظر دیده نشد (۵). لی و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که سطح بالای آلودگی خاک به هیدروکربن‌های نفتی (٤۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) منجر به کاهش ۲۹ درصدی محتوای کلروفیل شد. آن‌ها هم‌چنین گزارش دادند که در بالاترین سطح آلودگی خاک به هیدروکربن‌های نفتی (٤۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک)، تلقیح خاک



www.SID.ir

Archive of SID



با باکتری *Acinetobacter sp.* محتوای کلروفیل برگ گیاه برنج را ۱۱۵ درصد نسبت به تیمار بدون تلقیح خاک با باکتری افزایش داد (۲۸). هوانگ و همکاران (۲۰۰٤) به نتیجه مشابهی رسید (۲۰).

**تأثیر مواد نفتی بر مقدار پرولین:** جدول تجزیه واریانس نشان داد که تأثیر تلقیح خاک با باکتری، نوع گیاه و برهمکنش آن‌ها در سطوح مختلف نفت خام بر غلظت پرولین در گیاه معنی‌دار بود (جدول ٤). همان‌طور که در جدول ۵ مشاهده می‌شود با افزایش سطوح آلودگی نفتی میانگین غلظت پرولین در برگ تازه گیاهان به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت. به‌عنوان‌مثال در گیاه جو و چمن در تیمار ٤ درصد آلودگی نفتی در خاک (بدون تلقیح خاک با باکتری) غلظت پرولین در برگ تازه این گیاهان به‌ترتیب حدود ۳/۷ برابر و ۲/٤ برابر نسبت به شاهد (بدون آلودگی نفتی) افزایش یافت. اختلاف بین گیاهان در پاسخ به آلودگی نفتی می‌تواند مربوط به تفاوت در سطوح واکنش‌پذیری و تحمل آن‌ها به آلودگی نفتی باشد. حتی این تفاوت بین واریته‌های مختلف یک گونه گیاهی نیز وجود دارد. احتمالاً سطوح بالای آلودگی نفتی سبب افزایش فشار اسمزی محلول خاک شده و گیاه در پاسخ به این استرس غلظت پرولین را در برگ افزایش داده است. دلایل فیزیولوژیکی متعددی برای تجمع پرولین در واکنش به تنش گزارش شده است که مهم‌ترین آن‌ها تأکید بر نقش پرولین به‌عنوان یک ماده تنظیم‌کننده اسمزی و عامل حفاظت‌کننده آنزیم‌های سیتوپلاسمی و ساختمان غشا می‌باشد (۲۷). جدول ۵ نشان می‌دهد که تلقیح خاک با باکتری در خاک‌های آلوده و غیرآلوده سبب افزایش پرولین در برگ گیاهان شده است. هم‌چنین در هر گیاه با تلقیح خاک با باکتری غلظت پرولین در برگ تازه گیاهان افزایش یافت. به‌عنوان‌مثال در گیاه برموداگراس در سطح ٤ درصد آلودگی نفتی و بدون تلقیح خاک به باکتری غلظت پرولین در برگ تازه برابر با ۱/۰۵ میکرومول در گرم برگ تازه بود و با تلقیح خاک به باکتری *سودوموناس پوتیدا* و *آزوسپریلیوم براسیلنس* غلظت پرولین در برگ تازه به‌ترتیب به ۲/۲۱ میکرومول در گرم برگ تازه و ۱/٤۸ میکرومول در گرم برگ تازه رسید. اختلاف اثر بین باکتری‌ها بر غلظت پرولین در برگ تازه گیاهان می‌تواند مربوط به تفاوت توانایی آن‌ها در فراهمی عناصر غذایی برای گیاهان و بهبود شرایط رشد ریشه جهت جذب عناصر غذایی (به‌خصوص نیتروژن) باشد. افزایش مقدار پرولین برگ گیاهان با تلقیح خاک با باکتری ممکن است به‌دلیل نقش باکتری *آزوسپیریلوم براسیلنس* و *سودوموناس پوتیدا* در فراهمی نیتروژن برای گیاهان باشد که با افزایش جذب نیتروژن توسط گیاهان مقدار پرولین در برگ گیاهان نیز افزایش یافت (۲۳). ما و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که آلودگی خاک به نفت به‌میزان ٤۰ گرم در کیلوگرم خاک، پرولین برگ گیاهان *Mirabilis jalapa* و *Orychophragmus violace* را به‌ترتیب به‌میزان ۹۸ درصد و ۷۵ درصد نسبت به شاهد افزایش داد (۳۱). گاسین و همکاران (۲۰۱۵) بیان نمودند که استفاده از باکتری‌های محرک رشد باعث افزایش میزان پرولین می‌گردد (۱٦).

## نتیجه‌گیری کلی

هر سه گیاه سورگوم، جو و چمن کشت‌شده در خاک‌های آلوده به نفت خام، به آلودگی نفتی در خاک مقاوم بوده و در آن‌ها جوانه‌زده و رشد کردند. البته به‌نظر می‌رسد که پتانسیل گیاه سورگوم در کاهش آلودگی نفتی در خاک بهتر بوده است. در مجموع گونه انتخابی سورگوم نسبت به چمن و جو به‌علت دارا بودن شرایط فیزیولوژیک و بیوشیمیایی خاص نسبت به آلاینده‌های نفتی مقاوم‌تر بود و میزان کاهش بیوماس و کلروفیل برگ گیاه سورگوم نسبت به چمن و جو تحت تیمارهای آلودگی نفتی کمتر بود؛ و در



www.SID.ir

Archive of SID



پاسخ به تنش آلودگی نفتی در خاک غلظت پرولین در برگ تازه هر سه گیاه به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار بدون آلودگی نفتی در خاک افزایش یافت؛ و در هر گیاه حداکثر غلظت پرولین در برگ تازه، در بالاترین سطح آلودگی نفتی در خاک (۸ درصد وزنی) اندازه‌گیری شد.

اعمال تیمار باکتری‌های *سودوموناس پوتیدا* و *آزوسپریلیوم براسیلنس* نیز اثر معنی‌داری بر کاهش آلودگی نفتی در خاک نسبت به تیمار بدون باکتری داشتند. هم‌چنین عملکرد باکتری *سودوموناس پوتیدا* در حذف آلودگی نفتی در خاک بالاتر بود. از طرفی دیگر تلقیح خاک با باکتری‌ها اثرات منفی آلودگی نفتی بر گیاهان مورد آزمایش را کاهش داد.

کاربرد توأم گیاهان مورد آزمایش با باکتری‌ها سبب حذف بیش‌تر آلودگی نفتی در خاک نسبت به کاربرد هر یک از آن‌ها به‌تنهایی شد؛ بنابراین، براساس پژوهش حاضر چنین برمی‌آید که استقرار گیاه به همراه میکروارگانیسم‌ها می‌تواند به‌عنوان جزء کلیدی استراتژی حذف هیدروکربن‌های نفتی در نظر گرفته شود. همان‌طور که در نتایج این پژوهش مشاهده شد کاربرد توأم سورگوم با تلقیح خاک با باکتری *سودوموناس پوتیدا* بیش‌ترین کارایی را در حذف نفت خام در خاک داشت. ازاین‌رو، این گونه باکتری و گیاه را می‌توان برای زیست‌پالایی خاک‌های آلوده به نفت خام مورداستفاده قرار داد.

## منابع


1. Allison, L.E., and Moodie, C.D. 1965. Carbonate. P 1379-1396, In: C.A. Black et al. (ed), Methods of soil analysis, Part 2, American Society of Agronmy, Madison, WI. 1569p.
2. Andria, V., Reichenauer, T.G., and Sessitsch, A. 2009. Expression of alkane monooxygenase (alkB) genes by plant-associated bacteria in the rhizosphere and endosphere of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) grown in diesel contaminated soil. Environmental Pollution. 157: 3347-3350.
3. Arnon, D.I. 1956. Photosynthesis by isolated chloroplast. IV. General concept and comparison of three photochemical reactions. Biochimica Biophysica Acta. 20: 449-461.
4. Bacilio, M., Rodrguez, H., Moreno, M., Hernandez, J.P., and Bashan, Y. 2004. Mitigation of salt stress in wheat seedlings by a gfp-tagged *Azospirillum lipoferum*. Biology and Fertility Soils. 40: 188-193.
5. Barrutia, O., Garbisu, C., Epelde, L., Sampedro, M.C., Goicolea, M.A., and Becerril, J.M. 2011. Plant tolerance to diesel minimizes its impact on soil microbial characteristics during rhizoremediation of diesel-contaminated soils. Science of the Total Environment. 409: 4087-4093.
6. Basumatary, B., Saikia, R., Bordoloi, S., Das, H.C., and Sarma, H.P. 2012. Assessment of potential plant species for phytoremediation of hydrocarbon contaminated areas of upper Assam, India. J. Chem. Technol. Biotechnol. 87: 1329-1334.
7. Bates, L.S., Walden, R.P., and Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil. 39: 205-207.
8. Besharati, H. 2015. Microbial Remediation of Petroleum Contaminated Soils and the Role of Rhizosphere in Microorganisms Efficiency. Iran. J. Soil Res. 3: 573-584. (In Persian)
9. Beskoski, V.P., Gojgic-Cvijovic, G., Milic, J., Ilic, M., Miletic, S., and Solevic, T. 2011. Ex situ bioremediation of a soil contaminated by mazut (heavy residual fuel oil)-a field experiment. Chemosphere. 83: 34-40.
10. Bouyoucos, C.J. 1962. Hydrometer method improved for making particle size analysis of soils. Agron. J. 54: 464-465.




www.SID.ir

Archive of SID



11.Bremner, J.M. 1965. Total nitrogen. P 1148-1158, In: C.A. Black et al. (eds), Methods of soil analysis. Part 2, American Socie ty of Agronomy. Mandison, WI. 1569p.
12.Chapman, H.D. 1965. Cation exchange capacity. P 891-901, In: C.A. Black et al. (eds), Method of soil analysis. Part 2, American Society of Agronomy. Madison, WI. 1569p.
13.Chookhampaeng, S. 2011. The effect of salt stress on growth, chlorophyll content proline content and antioxidative enzymes of pepper (*Capsicum annuum* L.) seedling. Europ. J. Sci. Res. 49: 103-109.
14.Christopher, S., Hein, P., Marsden, J., and Shurleff, A.S. 1988. Evaluation of methods 3540 (soxhlet) and 3550 (Sonication) for evaluation of appendix IX analyses from solid samples. S-CUBED, Report for EPA contract 68-03-33-75, work assignment No. 03, Document No. SSS-R-88-9436. 17p.
15.Dar, M.I., Naikoo, M.I., Rehman, F., Naushin, F., Khan, F.A., Iqbal, N., Nazar, R., and Khan, N.A. 2016. Proline accumulation in plants: roles in stress tolerance and plant development. In: Iqbal N, Nazar R, Khan NA, editors. Osmolytes and plants acclimation to changing environment: emerging omics technologies. Springer, Pp: 155-66.
16.Gusain, Y.S., Singh, U.S., and Sharma, A.K. 2015. Bacterial mediated amelioration of drought stress in drought tolerant and susceptible cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). Afric. J. Biotechnol. 14: 764-773.
17.Hemke, P.H., and Spark, D.L. 1996. Potassium. P 551-574. In: D.L., Sparks et al. (Eds.). Method of soil analysis, part 3. Published by: Soil Science Societyof America, Inc. American Society of Agronomy, Inc. Madison, Wisconsin, USA. 1309p.
18.Henrique, F.S., Carmo, F.L., Paes, J.E.S., Rosado, A.S., and Peixoto, R.S. 2011. Bioremediation of Mangroves Impacted by Petroleum. Water, Air ans Soil Pollution. 216: 329-350.
19.Hewedy, A.M. 1999. Influence of single and multi bacterial fertilizer on the growth and fruit yield of tomato. Egypt J. Appl. Sci. 14: 508-523.
20.Huang, X.D., Alawi, Y.E., Penrose, D.M., Glick, B.R., and Greenberg, B.M. 2004. A multi process phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil. Environmental Pollution. 130: 465-476.
21.Hutchinson, S.L., Banks, M.K., and Schwab, A.P. 2001. Bioremediation and Biodegradation. Phytoremediation of aged petroleum sludge: Effect of inorganic fertilizer. Environmental Quality. 30: 395-403.
22.Jing, W., Zhongzhi, Z., Youming, S., Wei, H., Feng, H., and Hongguang, S. 2008. Phytoremediation of petroleum polluted soil. Petroleum Science and technology. 5: 167-171.
23.Kandowangko, N., Suryatmana, G., Nurlaeny, N., and Simanungkalit, R. 2009. Proline and abscisic acid content in droughted corn plant inoculated with *Azospirillum* sp. and arbuscular mycorrhizae fungi. Hayati J. Biosci. 16: 15-20.
24.Khan, M.S., Zaidi, A., Wani, P.A., and Oves, M. 2009. Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. Environmental Chemistry Letters. 7: 1-19.
25.Khosravinodeh, M., Abbaspour, A., Ebrahimi, S.S., and Asghari, H.R. 2013. Phytoremediation of a fuel oil-contaminated soil using alfalfa and grass with pseudomonas putida bacterium. J. Water Soil Cons. 20: 219-234.
26.Lee, K., and Gibson, D.T. 1996. Toluene and ethyl benzene oxidation by purified naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas sp*. Strain NCIB 9816-4. Applied Environmental Microbiology. 62: 3101-3106.
27.Levitt, J. 1980. Salt and ion stresses response of plant to environmental stresses. Academic press. 2: 365-488.



www.SID.ir

Archive of SID



28.Li, J.H., Gao, Y., Wu, S.C., Cheung, K.C., Wang, X.R., and Wong, M.H. 2008. Physiological and biochemical responses of rice (*Oryza Sativa* L.) to Phenanthrene and Pyrene. Inter. J. Phytoremed. 10: 106-118.

29.Lindsay, W.L., and Norvell, W.A. 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. Soil Sci. Soc. Amer. J. 42: 421-428.

30.Lu, M., Zhang, Z., Sun, S., Wei, X., Wang, Q., and Su, Y. 2009. The use of goosegrass (Eleusine indica) to remediate soil contaminated with petroleum. Water, Air and Soil Pollution. 29: 181-189.

31.Ma, H., Wang, A., Zhang, M., Li, H., Du, S., Bai, L., Chen, S., and Zhong, M. 2018. Compared the physiological response of two petroleum tolerant-contrasting plants to petroleum stress. Inter. J. Phytoremed. 20: 1043-1048.

32.Media, V.F., Maestri, E., Marmiroli, M., Dietz, A.C., and Mc Cutcheon, S.C. 2003. Plant tolerances to contaminants. P 189-233, In: S.C., Mc Catcheon, J.L., Schnoor (eds). Phytoremediation, transformation and control of contaminants, Wiley- Interscience. 1024p.

33.Merkl, N., Schultze-Kraft, R., and Infante, C. 2004. Phytoremediation in the tropics-the effect of crude oil on the growth of tropical plants. Bioremed. J. 8: 177-184.

34.Minai-Tehrani, D., Herfatmanesh, A., Azari-Dehkordi, F., and Minooi, S. 2006. Effect of salinity on biodegradation of aliphatic fractions of crude oil in soil. Pak. J. Biol. Sci. 9: 1531-1535.

35.Mishra, A., and Nautiyal, C. 2009. Functional diversity of the microbial community in the rhizosphere of chickpea grown in diesel fuelspiked soil amended with Trichoderma ressei using sole-carbon-source utilization profiles. World J. Microbiol. Biotechnol. 25: 1175-1180.

36.Mishra, S., Jyot, J., Kuhad, R.C., and Lal, B. 2001. In situ bioremediation potential of an oily- sludge-degrading bacterial consortium. Current Microbiology. 43: 328-335.

37.Moopam, P. 2010 .Manaul of oceanographic observation and pollutant analyses methods. 3th ed., Kuwit, 321p.

38.Olsen, S.R., Cole, C.V., Watanabe, F.S., and Dean, L.A. 1954. Estimation of available phosphorus in soil by extraction with sodium bicarbonate. USDA. Circ. 939. U.S. Gover. Prin. Office, Washington, DC, U. S. A.

39.Olukunle, O.F., and Oyegoke, T.S. 2016. Biodegradation of crude-oil by fungi Isolated from Cow Dung contaminated soils. Niger. J. Biotechnol. 31: 46-58.

40.Palmroth, M.R.T., Pichtel, J., and Puhakka, J.A. 2002. Phytoremediation of subarctic soil contaminated with diesel fuel. Bioresource Technology. 84: 221-28.

41.Peng, S., Zhou, Q., Cai, Z., and Zhang, Z. 2009. Phytoremediation of petroleum contaminated soils by *Mirabilis Jalapa* L. in a greenhouse plot experiment. J. Hazard. Mater. 168: 1490-1496.

42.Peretiemo-Clarke, B.O., and Achuba, F.I. 2007. Phytochemical effect of petroleum on peanut (*Arachis hypogea*) seedlings. J. Plant Pathol. 6: 179-182.

43.Radwan, S.S. 2009. Phytoremediatiom for oily desert soils. P 289-298. In: Singh, A., Kuhad, R.C., Ward, O.P. (eds.). Advanced in Applied Bioremediation. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 361p.

44.Robinson, S.L., Novak, J.T., Widdowson, M.A., Crosswell, S.B., and Fetterolf, G.J. 2003. Field and laboratory evaluation of the impact of tall fescue on polyaromatic hydrocarbon degradation in an aged creosote-contaminated surface soil. J. Environ. Engin. 129: 232-240.

45.Sasani, M., Khoramnejadian, S.H., and Safari, R. 2016. Evaluation of different parameters on Anthracene biodegradation by *Bacillus Spp* isolated from Babolrood River in Mazandaran province. J. Water Soil Cons. 22: 2019-231.



www.SID.ir

Archive of SID



46.Schnoor, J. 1997. Phytoremediation. The University of Iowa, Department of Civil and Environmental Engineering, Center for Global and Regional Environmental Research, Iowa. Technology Evaluation Report, TE-98-01. 30p.

47.Shimp, J.F., Tracy, J.C., Davis, L.C., Lee, E., Huang, W., Erickson, L.E., and Schnoor, J.L. 1993. Beneficial effects of plants in the remediation of soil and groundwater contaminated with organic pollutants. Critical Reviews in Environmental Science and Technology 23: 41-77.

48.Walkley, A., and Black, T.A. 1934. An examination of the deligaref method for determination organic matter and a propose modification of the chromic acid titration method. Soil Science. 37: 29-38.

49.White, P.M., Wolf, D.C., Thoma, G.J., and Reynolds, C.M. 2006. Phytoremediation of alklated polycyclic aromatic hydrocarbons in a crude oilcontaminated soil. Water, Air and Soil Pollution. 169: 207-220.

50.Wilts, C.C., Rooney, W.L., Chen, Z., Schwab, A.P., and Banks, M.K. 1998. Greenhouse evaluation of agronomic and crude oil phytoremediation potential among alfalfa genotypes. J. Environ. Qual. 27: 169-73.

51.Wu, M., Dick, W.A., Li, W., Wang, X., Yang, Q., Wang, T., Xu, L., Zhang, M., and Chen, L. 2016. Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil. International Biodeterioration and Biodegradation. 107: 158-164.

52.Yuan, S.Y., Chang, J.S., Yen, J.H., and Chang, B.V. 2001. Biodegradation of phenanthrene in River sediment. Chemosphere. 43: 273-278.

53.Zaki, M.S., Mohammad, M.N. Authman M.M.N., and Abbas, H.H.H. 2015. Bioremediation of petroleum contaminants in aquatic environments. Life Sci. J. 12: 127-139.



www.SID.ir

Arc

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

*J. of Water and Soil Conservation, Vol. 27(2), 2020*
*http://jwsc.gau.ac.ir*
*DOI: 10.22069/jwsc.2019.16529.3181*

# Simultaneous efficiency of phytoremediation and bioremediation in removing crude oil from soil

***H. Koohkan[1], A. Golchin[2], M.S. Mortazavi[3], F. Shahryari[4] and R. Hemati[5]**

[1]Ph.D. Student, Dept. of Soil Science, University of Zanjan, Zanjan, Iran, [2]Professor, Dept. of Soil Science, University of Zanjan, Zanjan, Iran, [3]Associate Prof. of Persian Gulf and Oman Sea Ecological Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Education and Extension Research Organization, Bandar Abbas, Hormozgan, [4]Assistant Prof., Dept. of Plant Protection, University of Zanjan, [5]Associate Prof., Dept. of Plant Protection, University of Zanjan

Received: 04.20.2019; Accepted: 01.12.2020

**Abstract**

**Background and Objectives:** Petroleum products are one of the most widely used chemicals in the modern world. Petroleum hydrocarbons have become a global problem for the environment. These compounds are highly resistant to the environment and are harmful to human health. Application of bioremediation process to remove polyaromatic hydrocarbons from contaminated soils is one of the most economical and desirable options. The purpose of this experiment was to investigate the percentage of hydrocarbon removal from soil polluted with hydrocarbons (crud oil) by sorghum, barely and bermudagrass with and wihout *Psudomonas putida* and *Azosprillum brasilense*.

**Materials and Methods:** In this study, simultaneous efficiency of phytoremediation and bioremediation in removal of crude oil from soil was investigated. For this purpose, a factorial experiment was conducted in a completely randomized design with three replications. The treatments consisted of three levels of soil contamination with oil (0, 4 and 8% oil), four herbal treatments (no plant, bermudagrass (*Cynodon dactylon*), sorghum (*bicolor Sorghum*) and barely *(Hordeum vulgare*)) and three bacterial treatments (no bacteria, *Psudomonas putida* and *Azosprillum brasilense*). To do the experiment, samples of five kg soil samples were contaminated with different amounts of crude oil and poured into plastic pots. After six weeks to reach the equilibrium of contaminated soils, these soils were inoculated with *Pseudomonas putida* and *Azospirillium brasilense* bacteria, then in polluted soils of inoculated with bacteria and no inoculated three gramineae species were planted. Ninty days after planting, plants were harvested.

**Results:** The results showed that interaction effects of treatments on the percentage of crude oil removal were significant at 1% probability level. Percentage of crude oil removal was significantly increased by plant cultivation alone, bacterial inoculation alone, and combined plant and bacterial application. Cultivation of plants was more effective than soil inoculation with bacteria in reducing the concentration of oil and plant increased bacteria function significantly so that, there were significant difference among treatments of plant alone, inoculation with bacteria alone and plant + bacteria. The highest removal percentage was observed in combined application of plant and bacteria. In each treatment with soil inoculation with bacteria, with increasing levels of oil pollution, dry weight of plants decreased but, at each level of crude oil pollution, inoculation of soil with bacteria, the dry weight of shoot increased. Soil inoculation with bacteria improved dry weight of shoot through removal of oil pollution in

* Corresponding Author; Email: koohkan_7001@yahoo.com



www.SID.ir

Archive of SID

soil. Chlorophyll concentration decreased significantly with increasing level of contamination. While, inoculating the soil with bacteria and reducing the negative effects of oil contamination and nitrogen availability on the plant, chlorophyll concentration in fresh leaves increased. With increasing levels of oil pollution, the mean proline concentration in fresh leaves of plants was significantly higher than that of control. Its highest concentration (in each plant) was obtained at 8% of crude oil pollution. Inoculation of soil with bacteria in polluted soils and non-polluted soils increases the amount of proline in the leaves of plants. In each level of crude oil pollution, inoculation of soil with bacteria, the proline concentration of leaf of plants increased. The highest concentration of proline was measured in the treatment of the highest oil pollution level (8% crude oil pollution) and inoculation with *Pseudomonas putida*.

**Conclusion:** Establishment of plant with microorganisms can be considered as a key component of the strategy to remove hydrocarbons. Consequently, these bacterial and plant species can be used for the biodegradation of soils contaminated with crude oil.

***Keywords:*** Bioremediation, Cholorophyll, Crude oil pollution, Phytoremediation, Proline



www.SID.ir

*www.SID.ir*